

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

LETALITÄTS-PRÜFUNGEN IM MÄUSETEST MIT DEN
6 TYPEN DES CLOSTRIDIUM (CL.) WELCHII UNTER
VERWENDUNG VERSCHIEDENER FLÜSSIGER NÄHRMEDIENT.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Pantelis Tzimas
Tierarzt aus Galatz/Rumänien

Berlin 1964
Journal-Nr. 471

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

LETALITÄTS-PRÜFUNGEN IM MÄUSETEST MIT DEN
6 TYPEN DES CLOSTRIDIUM (CL.) WELCHII UNTER
VERWENDUNG VERSCHIEDENER FLÜSSIGER NÄHRMEDIEN.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin



Vorgelegt von
Pantelis Tzimas
Tierarzt aus Galatz/Rumänien

Berlin 1964
Journal-Nr. 471

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. H.-J. Heidrich
Referent: Prof. Dr. H. Hartwig
Korreferent: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Lerche

Tag der Promotion: 17. 7. 64

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

	Seite
<u>Einleitung</u>	5
<u>Literatur</u>	
1. Allgemeine Betrachtung über die Toxine der 6 Cl. welchii Typen	7
2. Die bei der Maus letal wirkenden Toxine von Cl. welchii	9
3. Gesamtheit der für die Maus nach i. v. In- jektion letal wirkenden Toxine	16
<u>Eigene Versuche</u>	17
1. Material	18
2. Mäuse	18
3. Technik	19
a) Technik der Mäuseimpfung	19
b) Art der Züchtung	19
c) Einfluß der Bebrütungszeit auf die Toxinbildung der Bakterien	20
d) Herstellung des Toxins	22
<u>Ergebnisse</u>	24
<u>Besprechung</u>	36
<u>Zusammenfassung</u>	41
<u>Literaturverzeichnis</u>	42



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E i n l e i t u n g

Befunde von Clostridium (Cl.), welchii sind bei Tieren und Tierorganen, die zur Ermittlung einer Krankheits- oder Todesursache einer bakteriologischen Untersuchung unterliegen, nicht selten. Sie werden sich umso häufiger ergeben, je mehr von einem zuverlässigen Züchtungsverfahren für Anaerobier Gebrauch gemacht wird.

Seitdem im Institut die Anaerobenzüchtung mit dem Pyrogallol-K₂CO₃-Verfahren durchgeführt wird, hat sich die Zahl der Nachweise von Cl. welchii merklich erhöht. Bei Clostridium welchii-Befunden bleibt allerdings die Frage oft ungeklärt, welche Bedeutung dieser Keim in aetiologischer Hinsicht hat, da eine Typendifferenzierung nicht erfolgt und im Hinblick auf den Aufwand an Material und Zeit auf die Ermittlung von Toxinen im Untersuchungsmaterial verzichtet werden muß. Da die Erkennung des Types wesentlich davon abhängt, welche Toxine vorliegen oder gebildet werden, sind im Institut in verstärktem Maße Arbeiten mit dem Ziel aufgenommen worden, mit einfachen Mitteln eine Typendifferenzierung möglich zu machen.

Im Rahmen dieser Arbeiten wurde mir die Aufgabe übertragen zu prüfen, ob die Anwendung des relativ einfachen Mäuse-Letalitätstestes geeignet ist, für die Erkennung einzelner Typen oder Gruppen von Typen eine Hilfe zu bieten.

Wenn nach den Arbeiten der englischen Autoren, insbesondere von OAKLEY (22, 27), auch nicht zu bezweifeln ist, daß der Neutralisierungstest mit Antiseren die einzige zuverlässige Methode zur Erkennung der Typen des Cl. welchii und deren Toxine ist, so sollte durch den Letalitätstest an der Maus wenigstens versucht werden festzustellen, ob dieser Test eine Zuordnung eines unbekannten Stammes zu einer bestimmten Gruppe zuläßt.

Grundsätzlich lassen sich nach unseren Erfahrungen mit nicht konzentrierten Kulturfiltraten die 6 bekannten Typen von Cl. welchii in 2 Gruppen einteilen, und zwar eine, deren Toxine die Mäuse nach intravenöser Injektion töten und eine andere, die Mäuse nicht töten.

Unser Streben ging daher dahin, für die routinemäßige diagnostische Untersuchungstechnik eine einfache Methode zu finden, die eine Zuordnung zu einer der beiden Typengruppen ermöglicht.

Allgemeine Betrachtung über die Toxine der

6 Cl. welchii Typen

Die Toxine des Cl. welchii sind nicht wie die Diphtherie-toxine einheitlich zusammengesetzt, sondern bestehen ähnlich wie die Schlangengifte aus mehreren Partialgiften. Sie bringen teilweise die roten Blutkörperchen zur Auflösung, bewirken zum anderen Nekrose oder Einschmelzung der Gewebe oder rufen toxische Allgemeinwirkungen bei dem befallenen Organismus hervor. Sie bereiten indirekt die Erkrankung nach Infektion mit den Erregern vor (GLENNY u. Mitarb. (9)).

Die zur Vermehrung durch die Kultur verwendeten Nährmedien haben einen erheblichen Einfluß auf die Toxinbildung. Die Toxinproduktion hängt beispielsweise von der Höhe des Dextrosegehaltes, von dem Gesamt-Stickstoffgehalt, von dem pH-Wert und anderen Einflüssen ab. Jedoch ist für die Menge des Toxins nicht unbedingt das Keimwachstum entscheidend.

WILDFÜHR (41) stellte fest, daß die Toxinproduktion bei Einzelkolonien eines gleichen Stammes schwankte, also Kolonien mit guter oder mit schlechter Toxinbildung nebeneinander vorkamen.

Kulturen aus Einzelkeimen mit guter Toxinbildung können eine Unregelmäßigkeit in der Toxinproduktion zeigen. Demnach ist mit einer "toxischen Labilität" der Gasoedemerreger zu rechnen. Einige Stämme können ihre Toxineigenschaften auch ganz verlieren und werden als "degradierte Typen" angesehen.

Die Haltbarkeit des Toxins von allen Cl. welchii Typen ist, wie WILDFÜHR (41) nachwies, gegenüber dem Toxin anderer Gasoedemerreger begrenzt. Die verwendeten Nährsubstrate, ferner die Dauer und die Temperatur bei der Aufbewahrung, der pH-Wert und die Bebrütungszeit sind für die Haltbarkeit der Toxine wichtig. Es sind insgesamt 12 von den 6 Typen des Cl. welchii Stämmen gebildete Toxine bekannt, die durch

ihre verschiedene Wirksamkeit, die im Neutralisationsversuch mit typenspezifischen Seren aufgehoben werden kann, gekennzeichnet sind. Nicht jedes Toxin wird von allen Stämmen gebildet. Einzelne Typen haben aber gleiche Toxine. Andererseits sind wieder andere Typen durch bestimmte Toxine ausgewiesen, deren Mengen allerdings bei dem gleichen Typ Schwankungen unterliegen können. Nach Art der gebildeten Toxine werden 6 Typen unterschieden.

Einen Überblick über die von den Typen des Gl. welchii gebildeten Toxine gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die von den 6 Typen des Gl. welchii gebildeten Toxine nach OAKLEY u. WARRACK (27)

Bezeich- Wirkungsweise der Toxine: nung der Toxine		Das Vorkommen der Toxine im Kulturfiltrat der Gl. welchii Typen:					
		A	B	C	D	E	F
α	Letale, nekrotische, hämolytische (Lzithinase)	+++	+	+	+	+	+
β	Letale, nekrotische	-	+++	+++	-	-	+
γ	Letale	-	+	+	-	-	+
δ	Hämolytische, letale	-	+	++	-	-	-
ε	Letale, nekrotische (aktiviert durch Trypsin)	-	++	-	+++	-	-
η	Letale (Wirksamkeit zweifelhaft)	(+)	-	-	-	-	-
θ	Hämolytische (oxygen labil letale)	++-	+	+	+	+	-
ι	Nekrotische, letale (aktiviert durch Ttrypsin)	-	-	-	-	++	-
κ	Collagenase (letale, nekrotische, Gelatinase)	++	-	-	+-	+	-
λ	Proteinase; zersetzt Azocoll, pulverisierte Haut, aber nicht Collagen, Gelatinase	-	+++	-	+-	+	-
μ	Hyaluronidase	+-	+	-	+-	+	-
ν	Desoxyribonuclease	+	+	+	+	+	+
++- oder +- = nur vorhanden in einigen Stämmen							
(+) = begrenzt nur auf sehr wenige Stämme							

Die bei der Maus letal wirkenden Toxine von Cl. welchii

1. α -Toxin

Das α -Toxin findet sich in höchster Konzentration in jungen bis zu 24 Stunden alten Kulturen und wird von allen Cl. welchii Typen, vom Typ A aber gewöhnlich in besonders großen Mengen gebildet. EVANS (6) stellte eine Kollektion von 30 Stämmen zusammen, die in ihrer Mehrzahl menschlichen Ursprungs waren und prüfte jeden Stamm auf seine Eigenheit der In-vitro Erzeugung von α -Toxin ebenso wie auf sein Vermögen, bei Meerschweinchen eine Infektion hervorzurufen. Alle 30 Stämme erzeugten α -Toxin, aber der Autor fand große Unterschiede in den Mengen dieses Toxins. 5 Stämme erzeugten nur eine Spur von α -Toxin. Zwischen der α -Toxinmenge In-vitro und der Eigenschaft, eine tödliche Infektion der Meerschweinchen hervorzurufen, schien eine generelle Beziehung zu bestehen, da Stämme, die nur wenig α -Toxin erzeugten, eine tödliche Infektion nicht hervorriefen, andererseits die Mehrzahl der stärkeren Toxinbildner zuverlässig tödlich wirkten.

Auf Grund seiner Arbeiten (4 u. 5) glaubt EVANS, daß das α -Toxin die wichtigste Rolle bei der Gasgangräninfektion des Menschen mit Cl. welchii Typ A spielt. Als Lecithinase besitzt das Toxin die Fähigkeit, Lecithin und die Lecithingruppen zu zerlegen. Nach NAGLER (20) 1939 und SEIFFERT (35) 1939 ist das α -Toxin durch Opaleszenz des Menschenserums, die Kulturfiltrate des Cl. welchii hervorrufen, zu erkennen.

Ebenfalls auf Lecithinasewirkung führt man die haemolisierenden Eigenschaften des Toxins gegenüber den Erythrocyten der meisten Haustiere, ausgenommen von Pferd und Ziege zurück. Der Vorgang der Haemolyse ist durch die Zerstörung der Phosphatlipoidschicht in den roten Blutkörperchen charakterisiert.

Das α -Toxin läßt sich außerdem durch Spaltung von Lecithin

in Eigelb- Emulsion und die dadurch **entstehende Opaleszenz** nachweisen (**Lecithovitellintest**). Das α -Toxin ist nur in Gegenwart von Calcium- oder Magnesiumionen bei Erythrocyten und Eiemulsionen wirksam. Bei Ca-Ionen binden, wie z. B. Phosphate, Citrate, Fluoride.

Das Toxin wirkt letal für Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen, Tauben und Schafe bei intravenöser, intraperitonealer oder intramuskulärer Injektion. Bei intravenöser, **Applikation** erzeugt es typische Nekrosen. Tiere, die die intravenöse Injektion des Toxins mehrere Stunden überleben, erkranken an einer haemolytischen Anämie und Haemoglobinurie (OAKLEY (23) 1943). Durch Einwirkung von Formalin kann es nach längerer Betrüfung in ein Toxoid übergeführt werden.

Die Bestimmung einer unbekannten Toxinmenge ist nach MACFARLANE. OAKLEY und ANDERSON 1941 (7) dadurch möglich, daß man ermittelt, welche Menge eines spezifischen Antitoxins notwendig ist, um die Wirksamkeit des Toxins im Haemolyse-, Lecithovitellintest oder in einem anderen geeigneten Test zu neutralisieren.

2. β -Toxin

Das β -Toxin findet sich ähnlich wie das α -Toxin bei Typ A in höchster Konzentration in jungen Kulturen der Typen B und C, weniger in denen von F. Es verschwindet in Filtraten in **wenigen** Tagen und soll in großer Menge fast frei von ϵ -Toxin in 1 %iger Glucosebouillon gebildet werden (ROSS, 1950 (33)). β -Toxin wirkt letal und nekrotisierend. Nach intracutaner Injektion bei Meerschweinchen oder Kaninchen erzeugt es eine charakteristische purpurrote nekrotische Zone. Bei Lämmerdysenterie kommt das β -Toxin nach WRIGHT, 1950 (45) als wichtigste Toxin, besonders in den ersten Krankheitsstadien zur Wirkung. Unterstützend wirkt ferner das ϵ -Toxin.

Das klinische und pathologisch-anatomische Bild des Darmbrandes des Menschen ist nach ZEISSLER (1943) (46) auf das β -Toxin des Typus F zurückzuführen.

In Übereinstimmung mit dieser Auffassung stehen Befunde von OAKLEY (24), nach denen im Serum von 6 Personen, die den Darmbrand überstanden hatten, β -Antitoxin nachgewiesen werden konnte, während der Nachweis von α - oder γ -Antitoxin mißlang (OAKLEY (24)). Das β -Toxin wird durch Trypsin rasch inaktiviert. Durch Formalin läßt es sich in ein Toxoid überführen. Anakulturen haben gute immunisierende Eigenschaften. Eine Unterscheidung des β -Toxins von den anderen letal wirkenden Toxinen scheint durch eine Trypsinbehandlung möglich zu sein.

3. γ -Toxin

Das γ -Toxin wirkt letal. Es besitzt nicht die Fähigkeit, Haemolyse oder Nekrose hervorzurufen und wird in etwa gleich großer Menge von den Typen B, C und F gebildet. Die Unterscheidung dieses Toxins vom α -Toxin ist durch den Haemolyse- und Hautnekrosetest möglich.

4. δ -Toxin

Dieses Toxin findet sich in beachtlichen Mengen vornehmlich in jungen Kulturen der Typen B und C und wirkt haemolysierend auf die Erythrozyten von Schaf, Schwein, Ziege und Rind, jedoch nicht auf die Erythrozyten vom Pferd und Kaninchen. Es greift menschliches Serum oder Lecithovitellin nicht an und läßt sich in dieser Hinsicht vom α -Toxin unterscheiden. Auf die Maus und andere Versuchstiere wirkt es letal, eine nekrotisierende Eigenschaft auf die Haut ist nicht vorhanden.

5. C-Toxin

Das C-Toxin wird von den Typen D und B erzeugt und besitzt letale und nekrotisierende Eigenschaften. TURNER und RODWEL (39) zeigten im Jahre 1943, daß neben dem C-Toxin des Cl. welchii D und B noch ein atoxisches Protoxin C vorkommt, das durch die proteolytische Wirkung des Trypsins in ein Toxin übergeführt werden kann.

Nach gleichen Autoren wird die Aktivierung des Toxins nicht durch den Zerfall der Proteinmoleküle, sondern durch Ab Sprengen seitlicher Aminosäuren hervorgerufen. Dies erklärt, warum man durch die Flockungsreaktion mit einem spezifischen Antiserum zwischen einem Filtrat, das durch Trypsin aktiviert wurde, und einem unaktivierten Filtrat nicht unterscheiden kann. Der Flockungstiter bleibt in beiden Fällen unverändert.

Die Umwandlung des Protoxins in C-Toxin kann bei älteren Kulturen durch die Enzyme der Bakterien selbst bewirkt werden, aber dieser Vorgang dauert im Vergleich zur Trypsineinwirkung viel länger (TAYLOR A. (36)).

Das Protoxin soll in thermostabiler Form vorliegen und erst durch die Umwandlung thermolabil werden (ROSS 1950 (34)). BATTY und GLENNY (1) (1948) haben festgestellt, daß nach der Trypsinierung des C-Protoxins das Immunisierungsvermögen des C-Anatoxins im Vergleich zum Anatoxin, das aus unaktiviertem Toxin gewonnen wurde, wesentlich größer ist. Aktiviertes Toxin, das zur Immunisierung von Pferden gebraucht wurde, bewirkte im Vergleich zu inaktiviertem Toxin im Serum einen doppelt so hohen Antitoxintiter.

Die maximale Ausbeute an C-Protoxin hängt von der optimalen Bebrütungszeit, dem Nährboden und anderen Faktoren ab. Für die Produktion des C-Protoxins sind auch einige unbekannte Faktoren im Nährboden von Bedeutung, die das Wachstum der Kulturen in günstigem Sinne beeinflussen. Die

ϵ -Protoxinmenge kann so gering sein, daß sie nicht durch Trypsin aktivierbar ist. Die maximale Ausbeute an ϵ -Protoxin ist in hohem Maße von den verwendeten Stämmen abhängig. GRIGORIU und seine Mitarbeiter (10) haben 6 Stämme auf V. F. Nährboden kultiviert und diese v o r und n a c h Trypsinisierung an Mäusen geprüft. Nur 2 Stämme ergaben nach der Trypsinisierung einen höheren Titer als vorher festgestellt worden war.

Einige Autoren (10) haben beobachtet, daß manche Stämme von Cl. welchii die Fähigkeit zur Bildung mehrerer Toxinfraktionen besitzen, wenn sie mehrere Male über Nährböden fortgeimpft waren.

BICENKO (1960) (2) studierte an 12 Stämmen von Cl. welchii Typ D die Toxinbildung; er stellte fest, daß nur 7 ein ϵ -Protoxin bildeten, das durch Trypsin aktiviert werden konnte.

Die anderen 5 Stämme waren alte Kulturen, die die Fähigkeit der ϵ -Protoxinbildung verloren hatten und hinsichtlich der antigenen Struktur dem Typ A mehr entsprachen.

Auch Clostridium welchii Typ B, der an sich geringere Mengen ϵ -Toxin als der Typ D bildet, kann nach einigen Jahren die Fähigkeit der ϵ -Toxinbildung verlieren und gleicht dann in der Toxinproduktion dem Typ C.

6. η -Toxin

Das η -Toxin ist bislang nur in Kulturen eines Stammes des Typus A nachgewiesen worden (LECHIEN zit. n. CAKLEY (1943)). Es wirkt letal und besitzt keine haemolysierende oder nekrotisierende Eigenschaft.

7. θ -Toxin

Nach PREVOT (29) sind unsere Kenntnisse über das θ -Toxin noch sehr unvollkommen.

Das Toxin ist mit dem α -Toxin von PRIGGE (30) (1937) identisch. Es wirkt stark haemolysierend auf die Erythrozyten der meisten Versuchstiere, abgesehen von Mauseerythrozyten, die von dem Toxin nur schwach angegriffen werden. Nach Untersuchungen von EVANS (6) über die haemolytische Wirkungsweise des Cl. welchii A auf Blutagar von Pferden soll die Zone der vollständigen Haemolyse, die die Kolonien der α -Toxin und θ -Haemolysin-bildenden Stämme umschließt, das Ergebnis der Wirksamkeit des θ -Haemolysins und nicht der des α -Toxins sein; denn es trat keine Haemolyse auf, wenn θ -Anti-Haemolysin in dem Medium enthalten war. Die Haemolyse blieb ebenfalls bei Stämmen aus, die α -Toxin, aber kein θ -Haemolysin erzeugten. Bei Stämmen, die beide Toxine bildeten, kam es zu einer Zweizonen-Haemolyse, d. h. einem engen vollständig haemolytischen Ring um die Kolonie, der auf θ -Haemolysin zurückzuführen war, und einem ausge dehnteren, durch das α -Toxin bedingten haemolytischen Hof (partielle Haemolyse). Mit Blutagar von Pferden konnten Stämme erhalten werden, die kein θ -Haemolysin bildeten.

EVANS (6) beobachtete in der θ -Haemolysinproduktion sehr große Schwankungen. 1 Stamm gab die stärkste Konzentration, während 10 Stämme überhaupt kein θ -Toxin erzeugten.

Das θ -Toxin ruft beim menschlichen Serum oder Lecithovitellin keine Ausfällungen hervor und unterscheidet sich hierin vom α -Toxin. Es wirkt letal und auch nekrotisierend, unabhängig von Ca-Ionen (ZEISSLER (46)), wenn man es genügend konzentriert. Allerdings sind beide Teste zum Nachweis der Toxine nicht gut zu gebrauchen, weil die meisten Versuchstiere in ihrem Serum neutralisierende Normalantikörper besitzen. θ -Toxin ist sauerstoffempfindlich, wird durch Oxydation inaktiviert und läßt sich durch Reduktion reaktivieren (TODD, 1941 (38)). Es ist thermolabil. Durch Cholesterin und Kongorot wird es rasch inaktiviert (OAKLEY, 1943 (23)), durch Antistreptolysin O neutralisiert (ZEISSLER, 1958 (47)).

8. L-Toxin

Es wirkt letal. Bei Mäusen erzeugt es einen kräftigen Spasmus der Muskulatur, der besonders am Schwanz, Rücken und an den Hinterbeinen in Erscheinung tritt.

Nach intracutaner Injektion entsteht beim Meerschweinchen bereits nach 18 Stunden eine an der Injektionsstelle erkennbare Blässe. Die Blässe tritt am 3. Tage noch deutlicher in Erscheinung. Die nekrotisierende Wirkung des Toxins kann durch α -, β - oder ϵ -Antitoxin nicht neutralisiert werden. Das Toxin wird bei 65° C zerstört. Bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank aufbewahrt, büßt es seine Wirksamkeit nicht ein (GÜRTURK (11)).

Das L -Toxin soll ebenso wie das ϵ -Toxin eine Vorstufe besitzen, die durch Trypsin aktiviert wird (ROSS, WARREN u. BARNES (33)).

9. K -Toxin

Das von MASCHMANN (18) 1938 entdeckte K -Toxin wurde zunächst von OAKLEY, WARRACK und von VAN HEYNINGEN (25) (1946) auf Grund des positiven Ausfalles des Azocolltestes als Collagenase angesprochen. Weitere Versuche von OAKLEY, WARRACK und WARREN (26) (1948) zeigten, daß das K -Toxin auch Gelatine angreift und nach intramuskulärer Injektion am Oberschenkel bei Mäusen und Meerschweinchen in wenigen Stunden Schwellungen hervorruft, die bis zu 2 Tagen bestehen bleiben können. Nach intracutaner Injektion treten beim Meerschweinchen haemorrhagische und nekrotische Hautveränderungen auf.

Wenn das Toxin Mäusen intravenös injiziert wird, sollen diese Tiere als einziges Symptom Nasenbluten und bei der Sektion ausgedehnte Blutungen in der Lunge zeigen. Der Tod soll im allgemeinen innerhalb von 24 Stunden eintreten.

Gesamtheit der für die Maus nach intravenöser Injektion
letal wirkender Toxine

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß das α -, β -, γ -, δ -, ε -, η -, θ -, ι -, und κ -Toxin letale Eigenschaften für die Maus haben. Das η -Toxin kommt nur beim A-Typ vor, kann also bei den anderen Typen ausgeschlossen werden. Das δ -Toxin entfällt bei den A-, D-, E- und F-Typen. Das θ -Toxin ist bei unseren Versuchen kaum zu berücksichtigen, da wir unsere Toxinfiltrate nicht vor dem Einfluß des Luftsauerstoffes schützten. Das ι -Toxin wird nur vom Typ E gebildet, das κ -Toxin von den Typen A, C, D und E.

Bei letalen Wirkungen unserer Filtrate war demnach wohl in der Hauptsache mit der Wirkung des α -, β - und ε -Toxins zu rechnen.

E i g e n e V e r s u c h e .

Um zu prüfen, inwieweit sich die einzelnen Typen von *Clostridium welchii* durch Bildung für die Maus letal wirkender Toxine voneinander unterscheiden, wurden 6 bekannte Typstämme auf die letale Wirkung ihrer Toxine geprüft. Dabei war erforderlich in Erfahrung zu bringen, welche Art von Nährböden und welche Bebrütungszeiten für die Gewinnung maximaler für die Maus letal wirkender Toxinmengen günstig waren. Gleichzeitig sollte geklärt werden, ob unter den technischen Bedingungen des Institutes das Abzentrifugieren der Bazillen eine höhere Ausbeute an letal wirkendem Toxin erbrachte als die keimfreie Filtration durch Seitzfilter.

Der **L e t a l t e s t** an der Maus wird im positiven Fall durch eine Summe verschiedener Toxine bedingt, läßt also keine Aussage über die Typzugehörigkeit eines unbekannten Stammes zu, da die einzelnen letal wirkenden Toxine nicht bestimmt wurden. Trotzdem schien es uns lohnend zu sein festzustellen, welche Typen sich durch eine besonders starke letale Wirkung bei der Maus auszeichnen, und ob mittels des **Mäusetestes** eine Gruppeneinteilung der 6 Typen in stark toxische, weniger stark toxische und atoxische Stämme vorgenommen werden kann.

M a t e r i a l

Für die Untersuchungen standen uns 10 typisierte und 2 nicht typisierte Stämme zur Verfügung.

1.) Die Standard-Stämme

Typ A	CN	463	Typ B	CN	684
Typ C	CN	3690	Typ E	CN	1241

Die Stämme erhielten wir (die Stämme A, C und E im Juni 1962) als lyophilisierte Kulturen in Vacuumampullen von Burrrays, Wellcome & Co. aus London, Stamm Typ B im März 1963.

2.) Die Stämme Typ D 175 und Typ F (Behring)

wurden uns in dankenswerter Weise im März 1962 als lyophilisierte Kulturen in Vacuumampullen von Herrn Prof. Dr. Mitscherlich Göttingen überlassen.

3.) die Stämme

Typ A	CN	3920	Typ D	CN	3683
Typ E	CN	5063	Typ F	CN	3754

gingen uns am 4. 5. 64 ebenfalls von Burrrays, Wellcome & Co. zu.

Alle Stämme wurden zuerst in Le-Le- Bouillon (pH = 7,2) verimpft und nach 16stündiger Inkubation bei 37°C zur Überprüfung auf kulturelle Merkmale und Reinheit auf Traubenzucker-Blutagar-Platten subkultiviert.

4.) Den Cl. perfringens Stamm 202 überließ uns das Pettenkofer-Institut im April 1964. Der Stamm war 1956 aus von dem Liquor eines an Leukämie erkrankten Menschen isoliert worden.

5.) Den Stamm 975 erhielten wir am 27. 1. 1964 von

Herrn Dr. med. Hussels (Landes-Medizinal-Untersuchungsamt). Er war von einem am 3. Tag nach der Geburt gestorbenen Säugling isoliert worden.

M ä u s e

Alle Versuchsmäuse stammten aus eigener Nachzucht von Albino-mäusen des Stammes NMRI. Der Aufbau der Zucht erfolgte 1961 mit einem Mäusestamm der Gesellschaft für Versuchstierzucht,

Hannover-Linden.

Bei 1 - 2 % der Mäuse kamen bei über 1 Jahr alten Mäusen Mammatumoren vor.

Der Bestand war stets frei von Ektromelie. Außer Tumoren kamen keine Erkrankungen vor. Salmonellose wurde nicht festgestellt.

Alle für den Letal-Test benutzten Mäuse waren junge und gesunde Tiere weiblichen und männlichen Geschlechts im Gewicht von 18 - 20 g.

Technik der Mäuseimpfung

Den Mäusen wurden die keimfrei filtrierte Kulturfiltrate kurz nach Beendigung der Bebrütung - also frisch - intravenös appliziert, wobei als Höchstmenge 0,4 ml injiziert wurden.

Ich zog die intravenöse Injektion der intraperitonealen vor, weil sich die Wirkung des Inoculums bei der i. v. Injektion in kürzester Zeit zeigte.

Die Maus wird für diese Prozedur in ein rechteckiges Holzkästchen (Blut Röhrchen-Transportkästchen), das durch Halteschrauben am Tisch fixiert ist, mit dem Kopf in Richtung auf den verschlossenen Teil des Kästchens hineingesteckt. Durch einen genügend breiten Schlitz des am anderen Ende des Kästchens befindlichen beweglichen Verschlussdeckels wird das Schwanzende mit den Fingern der einen Hand festgehalten, um den Schwanz soweit herauszuziehen, daß die Injektion ausgeführt werden kann. Nach Abreiben mit Äther wird das Kulturfiltrat mit einer 1 ml- oder 0,5 ml-Spritze mit aufgesetzter feiner Kanüle Cro-ni 0,20 x 20 mm injiziert.

Art der Züchtung

Alle flüssigen Nährmedien, die in Röhrchen abgefüllt wurden, wurden durch eine Vaseline-schicht nach oben abgeschlossen. An 2 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Röhrchen 20 Min. bei 100° C im Dampftopf sterilisiert. Wurden die Röhrchen zu ei-

nem späteren Zeitpunkt verwendet, erfolgte vor der Beimpfung ein nochmaliges 10 Min. langes Erhitzen in kochendem Wasser.

Folgende Nährmedien wurden geprüft:

- 1.) Leber-Leberbouillon nach TAROZZI s. L. HALLMANN (12)
- 2.) Pope - Trypsin Verdauungsbrühe nach F. KAHLFELD s. HALLMANN (12)
- 3.) Martin - Pepsin Verdauungsbrühe s. HALLMANN (12)
- 4.) V. P. - Bouillon (40)
- 5.) Hirnbrei nach HIBLER s. HALLMANN (12)
- 6.) Herz-Rinderherz-Bouillon nach ROBERTSON s. HALLMANN (12)
- 7.) Schabefleisch-Bouillon nach JANSEN (15)
- 8.) Thioglykolat-Bouillon, U. S. Pat. (37)
- 9.) R. C. M. OXOID-Medium (37)
- 10.) Nährbouillon + 1 % Traubenzucker.

Einfluß der Bebrütungszeit auf die Toxinbildung der Bakterien

Wie aus der Literatur hervorgeht, spielt die Bebrütungszeit für die Toxinbildung der Bakterien eine große Rolle. Es wurde daher der Einfluß der Bebrütungszeit bestimmt, indem Le-Le-Bouillonkulturfiltrate der Welchii-Typen nach 4-, 6-, 16- und 24-stündiger Bebrütung Mäusen in Mengen von 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 - 5 Mäuse je Dosis - intravenös gespritzt wurden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Abhängigkeit der Toxinbildung (Letal-Toxin) bei den 6 Typen von Cl. welchii von der Bebrütungszeit der Le-Le-Bouillon.

Typ	Filtratdosis je Maus ccm	4 h	6 h	16 h	24 h
A	0,4	0/5	0/5	0/5	0/5
	0,3	0/5	0/5	0/5	0/5
	0,2	0/5	0/5	0/5	0/5
	0,1	0/5	0/5	0/5	0/5
B	0,1	5/5	5/5	5/5	5/5
	0,05	5/5	5/5	5/5	5/5
	0,03	4/5	3/5	5/5	3/5
	0,02	1/5	2/5	5/5	1/5
	0,01	--	--	5/5	--
C	0,4	0/5	0/5	0/5	0/5
	0,3	0/5	0/5	0/5	0/5
	0,2	--	0/5	0/5	0/5
	0,1	--	0/5	0/5	0/5
D	0,1	5/5	5/5	5/5	5/5
	0,05	4/5	5/5	5/5	5/5
	0,03	1/5	3/5	4/5	3/5
	0,02	1/5	2/5	3/5	1/5
E	0,4	0/5	0/5	0/5	0/5
	0,3	0/5	0/5	0/5	0/5
	0,2	0/5	0/5	0/5	0/5
	0,1	--	0/5	0/5	0/5
F	0,4	0/5	5/5	5/5	5/5
	0,3	0/5	5/5	5/5	5/5
	0,2	0/5	3/5	5/5	0/5
	0,1	--	0/5	0/5	0/5
	0,05	--	0/5	--	--

Erklärung: 1) Nenner = Zahl der für den Vers. verwendeten Mäuse
 2) Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse.

Bei den Typen B, D und F ist die Toxinwirkung bei einem 16 h Kulturfiltrat am stärksten, d. h. die Dosis, die zur Erzielung einer letalen Wirkung benötigt wird, ist am kleinsten. Daher wurde bei den darauffolgenden Versuchen immer mit einem 16 h Kulturfiltrat gearbeitet.

Bei den Typen A, C und E kam es bei den benutzten Bebrütungszeiten und Nährböden zu keiner toxischen Wirkung. Es wurde nicht untersucht, ob bei längeren Bebrütungszeiten die Toxine einzelner Typen noch tödlich auf die Maus wirkten.

Alle Versuche wurden 2 - 3mal wiederholt und kamen zu etwa gleichem Ergebnis. Das gilt auch für diejenigen Typ-Stämme, die doppelt oder mehrere Male vorhanden waren und unterschiedliche Bezeichnungen hatten.

H e r s t e l l u n g d e s T o x i n s

Die Toxingewinnung erfolgte zunächst versuchsweise mittels Seitz-Filtration, Zentrifugation und Ultra-Beschallung der Flüssigkultur.

Die Filtration durch S e i t z - Filter schien am geeignetsten zu sein, da sie die Keimzellen zuverlässig von dem flüssigen Substrat trennte. Es muß bei diesen Versuchen allerdings mit einem Verlust an Toxin gerechnet werden, wie mehrere Autoren (17) betonen.

Die Zentrifugation geschah zuerst mit 4000 U/Min. 40 Min. lang. Der Überstand erwies sich nicht frei von Bazillen.

Deshalb wurde die Zentrifugation mit hohen Umdrehungszahlen - Kühl-Zentrifuge mit 15000 U/Min. - eine halbe Stunde lang - versucht. Die überstehende Flüssigkeit wirkte nicht mehr letal, eine Feststellung, die unerklärlich blieb und nicht weiter verfolgt wurde.

Schließlich wurden die Kulturen noch 40 Min. ultrabeschallt (Frequenz: 800 knz), um die Bazillenleiber zur besseren Freisetzung des Toxins zu zertrümmern. Es gelang nicht, alle Bazillen abzutöten. Die längeren Stäbchen schienen überwiegend zerstört zu sein, die kürzeren Stäbchen überlebten die Beschallung und vermehrten sich in der Subkultur.

Auf Grund der Versuchsergebnisse benutzte ich ausschließlich 16-stündige Kulturfiltrate zur intravenösen Injektion bei Mäusen.

E r g e b n i s s e

Die Ergebnisse der Testungen der Filtrate, die mit verschiedenen Kulturmedien hergestellt wurden, sind in den Tabellen 3 - 12 dargestellt.

Es sei bemerkt, daß die Versuche mit den verschiedenen Typstämmen öfter wiederholt wurden und unerhebliche Abweichungen in den Inoculummengen, die tödlich wirkten, ergaben. Wenn von einer Dosis nicht alle 5 Mäuse getötet wurden, ist der Versuch regelmäßig wiederholt worden. Ergaben sich dabei letale Wirkungen bei der Hälfte der Mäuse, so wurde diese Dosis als Grenzdosis noch gewertet. Kam es hingegen im ersten Versuch zu 3 Todesfällen bei 5 Mäusen und überlebten im zweiten Versuch mehr als 3 Mäuse, so wurde diese Dosis nicht als zuverlässig letal wirkend gewertet.

Leber-Leber-Bouillon nach TAROZZI (Tabelle 3)

Bei der Le-Le-Bouillon betrug die geringste zuverlässig letal wirkende Dosis (ca. 50 %) (L. M. D.) bei Typ B 0,01 ccm, bei Typ D 0,03 ccm und bei Typ F 0,2 ccm. Das Toxin des B-Types war somit am wirksamsten. Es folgte das Toxin des Types D; am schwächsten war die Wirkung des Toxins des Typ F.

In den Filtraten der Typen A, C und E waren letale Toxine nicht nachweisbar. Dies besagt nicht, daß von diesen Typen überhaupt keine letalen Toxine gebildet worden waren, sondern bedeutet in unserem Fall nur, daß wir die Toxine in den untersuchten Filtraten mit dem Mäusetest nicht durch letale Wirkung nachweisen konnten.

Pope - Bouillon (Tabelle 4)

Das Filtrat der Pope-Bouillon wirkte bei den Typen B, D, F und E für die Maus toxisch. Die kleinste letale Dosis betrug bei den Typen B und D 0,02 ccm und bei den Typen E und F 0,1 ccm. Die Filtrate der Typen A und C töteten die Mäuse in der Höchstmenge von 0,4 ml nicht. Im Vergleich zu den

vorigen Versuchen war eine erhebliche Steigerung der Wirksamkeit bei den Typen D, E und F nicht zu verzeichnen.

Bemerkenswert ist jedoch, daß die letale Wirkung der Filtrate der Typen B und D unmittelbar nach der Injektion sichtbar wurde und die Mäuse kurze Zeit darauf starben. Lediglich bei den kleinsten Dosen kam es vor, daß die Zeit bis zum Tode etwas länger dauerte. Die Filtrate der Typen E und F wirkten nicht so spontan wie die Filtrate der Typen B und D. Es vergingen in der Regel mehrere Stunden, bis der Tod eintrat.

Thioglykolat-Bouillon- (Tabelle 5)

Bei diesem Medium konnte mit keinem Typ, selbst nicht einmal mit den Dosen von 0,4 und 0,3 ccm eine letale Wirkung gegenüber Mäusen erzielt werden.

Das Wachstum war bei allen Typen gut. Das Fehlen letal wirksamer Toxine in den Filtraten können wir uns nur so erklären, daß diese durch in der Bouillon enthaltene Stoffe - vielleicht durch das Thioglykolat - inaktiviert wurden.

Oxoid-Bouillon (Tabelle 6)

Das OXOID-Medium wird von den Herstellern der Fa. OXOID DIVISION für die Kultivierung von Anaerobiern empfohlen. Deswegen wurde es für die Gewinnung letal wirksamer Toxine der Cl. welchii Typen eingesetzt. Das Ergebnis war unbefriedigend; denn es bildeten nur die Typen B und D letale Toxine. Bei Typ B lag die L. M. D. bei 0,02 ccm, bei Typ D bei 0,01 ccm. Die Typen A, C, E und F erwiesen sich als nicht toxisch.

Robertson-Bouillon (Tabelle 7)

Die Robertson-Bouillon wurde für die Toxingewinnung benutzt, weil dieses Nährmedium von der Fa. WELLCOME, England, für die Züchtung von Anaerobiern empfohlen worden war. Wir konnten bestätigen, daß das Medium für die Produktion letaler Toxine der Typen B, D, E und F sich besonders gut eignete. Die

kleinste letale Dosis betrug für B 0,03 ccm, für D 0,01 ccm, für E 0,1 ccm und für F 0,01 ccm. Um die Grenzdosis bei Typ F möglichst genau zu ermitteln, wurden die Versuche zweimal wiederholt. Von insgesamt 3 x 5 injizierten Mäusen starben zweimal je 3 und 2 Mäuse. Die Grenzdosis von 0,03 ccm bewirkte somit bei 8 Mäusen einen letalen Effekt. Die Robertson-Bouillon eignete sich demnach besonders für die Produktion der letalen Toxine von E und F.

Martin-Pepsin-Verdaunungsbrühe (Tabelle 8)

Das Filtrat dieses Mediums war für die Gewinnung letaler Toxine gut brauchbar. Die Toxinproduktion wurde bei dem Typ F (M. L. D. 0,05) günstig beeinflusst.

Der Typ D erreichte eine M. L. D. von 0,01 ccm und der Typ B von 0,05. Das gebildete Toxin von Typ B wurde in 3 voneinander unabhängigen Versuchen an insgesamt 15 Mäusen geprüft. Im 1. Versuch starben 4 Mäuse, im 2. 2 Mäuse und im 3. Versuch 3 Mäuse. Bei den Typen A, C und E waren letal wirkende Toxine in den Kulturfiltraten nicht nachweisbar.

1 %-ige Traubenzuckerbouillon (Tabelle 9)

Dieses Medium schien nicht günstig für die Produktion eines letalen Toxins zu sein. Lediglich der Typ D erzeugte bis zur Grenzdosis 0,005 ccm letale Wirkungen. Die Filtrate aller übrigen Typen wurden von den Mäusen bis zu einer Injektionsmenge von 0,4 ccm reaktionslos vertragen. Die Ergebnisse dieser Versuche erhielten durch zweimalige Wiederholung der Mäuseversuche an insgesamt 15 Mäusen mit Typ D eine Stütze.

Die Filtrate der Typen A, B, C, E, und F blieben bei allen Versuchen ohne Wirkung.

Die optimale Produktion des letalen Toxins des Typ D durch diesen Nährboden möchten wir damit in Zusammenhang bringen, daß ein besonders günstiger Einfluß des Traubenzuckers auf die Produktion des -Toxins des Typs D vorhanden ist, wie durch

andere Untersucher festgestellt wurde.

Schabefleisch-Bouillon (Tabelle 10)

Die rumänischen Autoren GRIGORIU und Mitarbeiter (10) haben diese Bouillon für die Gewinnung gut immunogener Toxine empfohlen und die Rezeptur angegeben.

Die Toxine der Typen B und D waren in den Filtraten in einer wirksamen Menge von 0,02 ccm und 0,01 ccm vorhanden. Gegenüber anderen Nährmedien erzeugten die Typen E und F in der Schabefleisch-Bouillon nur geringe Toxinmengen, die Typen A und C wirkten nicht letal.

Hirnbrei nach HIBLER (Tabelle 11)

Die Ergebnisse mit diesem Medium waren unbefriedigend. Die Typen D, E und F erreichten Grenzdosen von 0,05, 0,4 bzw. 0,3 ccm. Mit den Typen A, B und C ließen sich letal wirkende Toxine nicht nachweisen. Der Versuch ist insgesamt zweimal wiederholt worden, ohne daß sich am Ergebnis etwas änderte.

V. F.-Medium (Tabelle 12)

Das V. F.-Medium wird aus Rindfleisch, Schweinemagen und Rinderleber hergestellt und erhält ähnlich wie die Tarozzi-Bouillon einen Zusatz von Leberstückchen, außerdem von 1 % Traubenzucker.

Im Gegensatz zu allen anderen Kulturfiltraten erreichte die V. F.-Bouillon im ersten Versuch eine letale Wirkung des Filtrates bei Typ A bei den Dosen 0,3, 0,2 und 0,1.

Als der Versuch an 5 weiteren Mäusen wiederholt wurde, ließ sich ein letales Toxin mit den Dosen 0,3 - 0,1 ml nicht mehr nachweisen. Wir haben die Versuche noch ein drittes Mal mit dem gleichen negativen Ergebnis wiederholt und weiterhin versucht, die toxische Wirkung durch Zusatz von 1 % bzw. 2 % Ca Cl_2

zu erhöhen. Auch diese Versuche waren negativ. Ebenso war es nicht möglich, mit den anderen A-Stämmen ein letales Toxin nachzuweisen.

Das Toxin des Typ B tötete Mäuse noch in einer Menge von 0,01 ccm, das des Types D in einer Menge von 0,005 ccm, das des Types E in einer Menge von 0,1 ccm und das des Types F in einer Menge von 0,1 ccm. Die Filtrate von Typ C waren unwirksam.

Tabelle 3: Letalitäts-Test des Filtrates einer 16-stündigen
Le-Le-Bouillon, pH-Wert 6,2 - 6,7.

Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus
i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01	0,005
A	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--
B	--	--	--	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5
C	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--
D	--	--	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	--	--
E	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--
F	5/5	5/5	5/5	1/5	--	--	--	--	--

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Tabelle 4: Letalitäts-Test des Filtrates einer 16-stündigen
Pope-Bouillon, pH-Wert 6,0 - 6,4

Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus
i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01
A	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
B	--	--	--	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5
C	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
D	--	--	--	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5
E	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	--	--	--
F	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	--	--	--

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Tabelle 5: Letalitäts-Test des Filtrats einer 16-stündigen Thioglykolat-Bouillon, pH-Wert 6,0 - 6,4.

Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
A	0/5	0/5	0/5	0/5	--
B	0/5	0/5	0/5	0/5	--
C	0/5	0/5	0/5	0/5	--
D	--	0/5	0/5	0/5	0/5
E	0/5	0/5	0/5	0/5	--
F	0/5	0/5	0/5	0/5	--

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Tabelle 6: Letalitäts-Test des Filtrats einer 16-stündigen OAOID-Bouillon, pH-Wert 6,0 - 6,4

Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01	0,005
A	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--
B	--	--	--	--	5/5	5/5	3/5	--	--
C	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--
D	--	--	--	--	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5
E	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--
F	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Tabelle 7: Letalitäts-Test des Filtrats einer 16-stndigen
Robertson-Bouillon, pH-Wert 6,0 - 6,4
Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus
i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01
A	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
B	--	--	5/5	5/5	0/5	0/5	--	--
C	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
D	--	--	--	5/5	5/5	4/5	1/5	0/5
E	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	--	--	--
F	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	--	--

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Tabelle 8: Letalitäts-Test des Filtrats einer 16-stndigen
Martin-Pepsin-Verdauungsbouillon, pH-Wert 6,0 - 6,4
Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus
i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01
A	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
B	--	--	--	5/5	3/5	2/5	--	--
C	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
D	--	--	--	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5
E	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
F	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	--	--	--

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Tabelle 9: Letalitäts-Test des Filtrats einer 16-stündigen Nährbouillon mit 1 % Traubenzucker, pH-Wert 6,0 - 6,4
Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,03	0,01	0,005	0,003	0,001
A	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--	--
B	--	--	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
C	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--	--
D	--	--	--	--	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5
E	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--	--
F	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--	--	--

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Tabelle 10: Letalitäts-Test des Filtrats einer 16-stündigen Schabefleisch-Bouillon, pH-Wert 6,4 - 6,7
Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01
A	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
B	--	--	--	5/5	5/5	5/5	3/5	--
C	0/5	0/5	0/5	0/5	--	--	--	--
D	--	--	--	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5
E	5/5	5/5	1/5	0/5	--	--	--	--
F	5/5	5/5	5/5	2/5	--	--	--	--

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Tabelle 11: Letalitäts-Test des Filtrats eines 16-stündigen Hirnbreis nach HIBLER, pH-Wert 6,0 - 6,4
Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,03	0,02
A	0/5	0/5	0/5	0/5	—	—	—
B	—	—	—	0/5	0/5	0/5	—
C	0/5	0/5	0/5	0/5	—	—	—
D	—	—	—	5/5	5/5	2/5	0/5
E	5/5	1/5	0/5	0/5	—	—	—
F	—	4/5	1/5	0/5	—	—	—

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Tabelle 12: Letalitäts-Test des Filtrats einer 16-stündigen V. F.-Bouillon, pH-Wert 6,4 - 6,7
Menge in ml des injizierten Kulturfiltrates bei Maus i.v.

Typ	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05	0,03	0,02	0,01	0,005	0,003
A	—	5/5	5/5	5/5	—	—	—	—	—	—
B	—	—	—	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	—	—
C	0/5	0/5	0/5	0/5	—	—	—	—	—	—
D	—	—	—	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5
E	—	5/5	5/5	3/5	—	—	—	—	—	—
F	—	5/5	5/5	4/5	—	—	—	—	—	—

Erklärung: Zähler = Zahl der gestorbenen Mäuse
Nenner = Zahl der verwendeten Mäuse

Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse der Prüfung von Filtraten, die mit verschiedenen Nährmedien gewonnen worden waren, auf letale Wirksamkeit.

Eine Übersicht über die Ergebnisse des Letal-Testes gibt die Tabelle 13. Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß das V. F.-Medium für die Gewinnung des für die Maus letalen Toxins besonders günstig ist, denn die Grenzwerte lagen bei diesem Medium bei allen Typstämmen relativ niedrig. In einem einzigen Versuch gelang es in der V. F.-Bouillon bei Typ A eine letale Wirkung des Filtrates nachzuweisen. Dieses Ergebnis ließ sich aber in 4 weiteren Versuchen nicht reproduzieren.

Das Nährmedium nach ROBERTSON und die Martin-Pepsin-Bouillon hielten sich etwa die Waage. Der Typ E produzierte in der Robertson-Bouillon ein letal wirksames Toxin bei der Grenzdosis von 0,1 ml, während in der Martin'schen Bouillon ein solches Toxin selbst bei einer Injektionsdosis von 0,4 ml nicht nachzuweisen war. Die Pope-Bouillon war in dieser Hinsicht der Robertson-Bouillon gleichwertig.

Für den Typ B schien die Pope-Bouillon günstiger zu sein als die Bouillon nach Robertson und Martin.

Eine 1 % Traubenzucker-Bouillon brachte keine Steigerung in der Toxinbildung bei den Typen B, E und F. Jedoch wurde die Toxinbildung des Typs D durch den Traubenzuckerzusatz gefördert.

Die Hirnbrei-Nährbouillon nach HIBLER war wenig günstig, ebenso ließ sich mit dem OXOID-Medium ein Mehr an letalem Toxin nicht erzielen.

Die Rhizoglykolat-Bouillon war für die Toxinbildung aller Typen ungünstig.

Tabelle 13: Übersicht über die kleinsten letal wirkenden
Filtratmengen in ccm bei den verschiedenen
Nährmedien

Bezeichnungen der Nährmedien:

Typ	Le-Le- Bouill.	Pope	Thio- glyko- lat	OXOID	Ro- bert- son	Mar- tin- Pep- sin	+ 1% Nähr- bouill.	Scha- be- fleisch	Hirn- brei	V. F.
A	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,1
B	0,01	0,02	--	0,02	0,1	0,05	--	0,02	--	0,01
C	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
D	0,03	0,02	--	0,01	0,03	0,01	0,005	0,01	0,05	0,005
E	--	0,1	--	--	0,1	--	--	0,3	0,4	0,1
F	0,2	0,1	--	--	0,05	0,05	--	0,2	0,3	0,1

B e s p r e c h u n g

Die bakteriologische Diagnostik der Gasödeminfektionen der Tiere ist schwierig. Das gilt namentlich für Infektionen, die das Cl. welchii bedingt und die, klinisch oder pathologisch-anatomisch nicht so ausgeprägt sind, daß eine zuverlässige Diagnose gestellt werden kann.

Die Isolierung des Bazillus im Tierkörper ist leicht möglich, aber da das Cl. welchii normalerweise im Darminhalt vorkommt und postmortal von hier in die blutreichen Organe eindringen kann, bleibt die Frage offen, ob der Keim eine aetiologische Bedeutung hat oder nicht. Der Nachweis von Toxinen im Darminhalt oder in den Organen gestorbener Tiere kann die Diagnose stützen. Es ist aber beim negativen Ergebnis der Prüfung auf Toxine nicht sicher, ob sich diese nicht durch Verdünnung dem Nachweis entzogen haben können. Auch können die Toxine durch Zersetzung und Resorption denaturiert werden, so daß sie an ihren charakteristischen Eigenschaften nicht mehr erkennbar sind. Schwierig dürfte es schließlich sein, bei Ermittlung bestimmter Toxine die unspezifische Wirkung von Verdauungs- und Resorptionsprodukten auszuschließen. Wir glauben daher, daß der Nachweis bestimmter, insbesondere für die einzelnen Typen des Cl. welchii spezifischer Toxine im toten Tierkörper für die Diagnose viel bedeuten kann, wenn Tierart und klinischer und pathologisch-anatomischer Befund bekannt sind und die für den Typ spezifischen Toxine durch Antiseren ermittelt werden. Fundort, Tierart und Krankheitsbild dürften im Zusammenhang mit der Feststellung einzelner Toxine eine Wahrscheinlichkeitsdiagnose ermöglichen, die den Vorzug hat, keinen erheblichen Aufwand an Zeit und Material zu erfordern.

Diesen Überlegungen folgend, prüften wir ohne Rücksicht auf die Verschiedenartigkeit der letal wirkenden Toxine 6 bekannte Typen des Cl. welchii auf ihre Produktion der im Mäuseversuch letal wirkenden Toxine. Wir bedienten uns dabei der Kultivierung auf verschiedenen flüssigen Nährmedien, um ein geeignetes Medium zu finden, das die quantitativen Unterschiede der Toxin-

bildung bei den einzelnen Typen aufzeigte. Diese Unterschiede wollten wir zu einer Einordnung in eine stark toxische, mäßig stark toxische und eine atoxische Gruppe verwenden.

Die umfangreichen Arbeiten der englischen und französischen Autoren über die Toxindifferenzierung lassen keine Zweifel über die Bedeutung der von den Autoren empfohlenen Methoden der Toxindifferenzierung mittels der Neutralisationsteste. Aber wir gingen von der Vorstellung aus, eine Gruppeneinteilung mit Hilfedes Gesamtkomplexes mäuseletaler Toxine für die routinemäßige Untersuchung isolierter Welchii-Stämme unter Verzicht auf den Neutralisationstest mit Antiseren zu ermöglichen. Nach ROBERTS (32) basiert die Klassifikation der 4 Welchii-Typen A - D auf dem Nachweis von 3 letalen Faktoren in den Kulturfiltraten. WILSDON (43) bestimmte die Faktoren und bezeichnete sie mit den Buchstaben W, Z und X. Typ A produzierte den W-Faktor, Typ B den W-, Z- und X-Faktor, Typ C den W- und Z-Faktor und Typ D den W- und X-Faktor.

GLENNY, BARR, LLEWELLY-JONES, DALLING und ROSS (9) fanden, daß sich die Z-Faktoren aus 3 toxischen Komponenten zusammensetzten. Sie benutzten das griechische Alphabet für die Bezeichnung der Toxine und legten für die 4 Typen folgendes Toxinschema zugrunde:

Typ A = α (Wilsdon's W)

Typ B = α (β , γ , δ) = (Wilsdon's Z), = (Wilsdon's X)

Typ C = α (β , γ , δ) "

Typ D = α ϵ

OAKLEY und WARRACK (27) haben schließlich das auf S. 8 wiedergegebene Schema der löslichen Antigene der 6 Welchii-Typen entworfen und vorgeschlagen, die Differenzierung der Typen mit Hilfe des Neutralisationstestes mit Antiseren durchzuführen. Weitere Tests dienten zum Nachweis des Haemolysins, der Lecithinase und anderer Faktoren. Wenn man bedenkt, daß beim Menschen und beim Tier bestimmte Welchii-Typen bestimmte Krankheiten hervorrufen, so ist es verständlich, daß bei iso-

lierten Stämmen, die im Typ nicht bekannt sind, nur eine begrenzte Auswahl von Typen in Betracht gezogen werden muß. Allerdings ist die Einschränkung zu machen, daß nicht jeder Stamm tierartspezifisch ist. Beim Schaf spielen die Lämmerdysenterie (Typ B, evtl. C), die Enterotoxaemie (Typ D) und der Struck (Typ C) eine Rolle. Mithin wird man bei dieser Tierart in der Hauptsache mit den 3 Typen B, C und D zu rechnen haben. Für den Menschen gelten die Typen A und F als spezifisch. Beim Menschen werden also vorwiegend die Typen A und F vorkommen.

Krankheitsbild, Fundort und letal wirkender Toxinkomplex können daher für die Differenzierung des Types wie auch für die Diagnose eine gewisse Bedeutung haben.

Ähnlich wie WILDFÜHR kamen wir bei einer Prüfung der Kulturfiltrate verschiedener flüssiger Nährmedien, die nach 16stündiger Bebrütung auf ihre toxische Wirksamkeit an der Maus getestet wurden, zu dem Ergebnis, daß die Pope-Bouillon ein sehr brauchbarer Nährboden für die Gewinnung maximaler Mengen des letalen Toxins ist.

Auf den Nährmedien V. F. und der Robertson-Bouillon schienen einzelne Typen noch größere Mengen eines letalen Toxins zu produzieren, aber die Pope-Bouillon erfüllte insofern unsere Ansprüche, als Unterschiede in der letalen Wirksamkeit der verschiedenen Typen deutlich hervortraten und damit eine Einordnung in die 3 Gruppen möglich war.

Die von WILDFÜHR festgestellte Labilität der Toxine bei gleichen Nährböden, gleicher Bebrütungszeit, gleicher Beimpfung und gleichem pH-Wert konnten wir nicht bestätigen. Es kamen zwar geringe Schwankungen um 1 Titerstufe in der toxischen Grenztiterdosis vor, wir beobachteten aber sonst eine auffallende Gleichmäßigkeit der Ergebnisse, wenn wir uns der Pope-Bouillon bedienten und keine Konzentrierung der Toxine durch Ausfällung durchführten. Es sei bemerkt, daß wir alle Versuche wiederholten und dabei stets zu etwa gleichen Ergebnissen kamen.

Filtrate von Typen, die kein nachweisbares letales Toxin bildeten - wie die Typen A und C - blieben für die Maus immer atoxisch. Offensichtlich handelte es sich bei diesen Typen um eine unterschwellige Toxinmenge in den Filtraten. Denn bei Versuchen, die HINZ (14) ausführte, ließ sich durch Konzentrierung mittels Säurefällung vnschwer der Beweis führen, daß in den Filtraten des Types A Toxine enthalten waren, die für Mäuse toxisch wirkten. In der Hauptsache dürfte es sich dabei um das -Toxin gehandelt haben, kam es doch bei uel i. v. injizierten Mäusen zu einem Blutharnen, das für die Wirkung des -Toxins als kennzeichnend beschrieben worden ist (28).

2 als Typ A typisierte und 2 nicht typisierte Stämme menschlichen Ursprungs verhielten sich bei der Prüfung ebenso wie der Typ A-Stamm. In je 5 verschiedenen Testungsversuchen an je 5 Mäusen wurden diese Ergebnisse erzielt. Lediglich bei der V. F.-Bouillon, die wir zu unseren weiteren Versuchen nicht verwendeten, kam es bei dem A-Stamm vor, daß die Dosis 0,1 ml toxisch wirkte. Trotz zahlreicher Wiederholungen war das Ergebnis nicht reproduzierbar.

Mäßig stark letal wirkende Toxine bildeten die Stämme E und F, wobei F dem Stamm E gering überlegen war.

Am stärksten letal wirkten die Toxine der Typen B und D, so daß diese Typen in die Gruppe der stärksten Toxinbildner zu stellen sind.

Daß die Verwendung anderer Nährmedien als der Pope-Bouillon für die Ermittlung des mäuseletalen Toxin-Komplexes und die Einordnung der Stämme in die 3 Gruppen einen Vorteil bedeutet, glauben wir nicht. Die Erfahrung mit der Pope-Bouillon, deren Herstellung stets in gleicher Weise erfolgte, bestätigte, daß die Ergebnisse gut reproduzierbar waren und dieser Nährboden in der letalen Wirkung der Filtrataosen bei den einzelnen Typstämmen die Unterschiede gut hervortreten ließ.

Es ist zuzugeben, daß einzelne Nährmedien bei dem einen oder anderen Typ eine bessere Ausbeute an letalem Toxin zu-
liessen. Hierauf kam es uns aber bei unseren Versuchen nicht
an, weil wir die vorkommenden Unterschiede in der Toxinpro-
duktion und -wirkung für eine Gruppeneinteilung verwenden
wollten.

Wir sind der Auffassung, daß für die Typerkennung der Letal-
Test an Mäusen mit Bouillonkulturfiltraten, die mit Pope-
Bouillon gewonnen werden, von Nutzen sein kann und dieser
Test eine besondere Eignung für die Routineuntersuchung hat.
Die Frage bleibt offen, welche weiteren Tests angewendet
werden können, um in dem Komplex der Toxine typspezi-
fische Toxine zu differenzieren. Der Hautnekrosetest dürfte
nach MATTHES (19) hierzu kaum geeignet sein, da Letal- und
Hauttest in ihren Ergebnissen bei Verwendung von Filtraten
weitgehend übereinstimmen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

1. Die Pope-Bouillon erwies sich für die Gewinnung toxigener Filtrate bei der Mehrzahl der 6 Typen von Cl. welchii als geeignet.
2. Eine 16-stündige Bebrütung der beimpften Pope-Bouillon ergab maximale Mengen des mäuseletalen Toxins bei denjenigen Typen des Cl. welchii, die als stärkere Toxinbildner bekannt sind.
3. Der Letaltest an der Maus mit nicht konzentrierten Pope-Bouillonkultur-Filtraten ermöglicht eine Unterscheidung der 6 Typen von Cl. welchii.
4. Nach dem Letaltest gehören zur Gruppe der starken Toxinbildner die Typen B und D. Die Typen E und F sind mäßig starke Toxinbildner, während A und C sich als "atoxisch" erwiesen.
5. Es bleibt zu klären, welche zusätzlichen Teste verwendet werden können, um einzelne letal wirkende Toxine zu differenzieren. Bei den Typen B und D bietet sich die Trypsinbehandlung an, da Trypsin das β -Toxin des Types B inaktiviert, das ϵ -Toxin des Types D hingegen aktiviert.
6. Der Mäuseletaltest erfordert bei Verwendung von Popebouillonkultur-Filtraten keinen erheblichen Aufwand an Zeit und Material und kann als Methode für die Typenermittlung routinemäßig durchgeführt werden.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Batty, J. u.
Glenny, A. T. The antigenic efficiency Cl. welchii type D epsilon toxin and toxoid after treatment with trypsin.
Brit. J. Exper. Path. 29, 141 (1948)
2. Bicenکو, B. D. Zit. nach Griguriu und Mitarb. (10)
3. Bosworth, T. J. On a new type of toxin produced by Clostridium welchii.
J. Comp. Path. 53, 245 (1943)
4. Evans, D. G. The protective properties of alpha antitoxin and theta anti-haemolysin occurring in the Cl. welchii type A antiserum.
Brit. J. Exper. Path. 24, 81 (1943)
5. Evans, D. G. The protective properties of the alpha antitoxin and antihyaluronidase occurring in Cl. welchii type A serum.
J. Path. Bact. 55, 427 (1943)
6. Evans, D. G. The in vitro production of a toxin, θ -toxin and hyaluronidase by strains of Cl. welchii type A, on the relationship of in vitro properties to virulence in guinea pigs.
J. Path. Bact. 57, 75 (1945)
7. MacFarlane, M. G.,
Oakley, G. L. u.
Anderson, C. G. Haemolysis and the production of opalescence in serum and lecithovitellin by the α -toxin of Clostridium welchii.
J. Path. Bact. 52, 93 (1941)
8. MacFarlane, M. G. u.
Knight, B. C. J. C. The biochemistry of bacterial toxins I. The lecithinase activity of Cl. welchii toxins.
Biochem. J. 35, 884 (1941)
9. Glenny, A. T. u. a. Multiple toxins produced by some organisms of the Cl. welchii group.
J. Path. Bact. 37, 53 (1933)

10. Grigoriu, H. u. a. Cerceteri Asupra Valonii
Immunizante A. protoxinei
Clostridium Perfringens, Toup D,
activata cu tripsina.
Lucrarile stint. ale Inst. de
Seruri si Vaccinuri Pasteur
Bucaresti, 7, 263 (1962)
11. Gürtürk, S. Die Typen des Clostridium welchii,
ihre Differenzierung und pathogene
Bedeutung.
Vet. med. Hab.-Schr. Hannover (1952)
12. Hallmann, L. Bakteriologische Nährböden.
G. Thieme Verl., Stuttgart (1953)
13. Heyningen, W. E. van The biochemistry of the gas
gangrene toxins.
Biochem. J. 35, 1246 (1941)
14. Hinz, K. H. Mündliche Mitteilung
15. Jansen, B. C. u.
Alexander, R. A. Lucrane comunicata la reuniunea
F. A. O./O. I. E. din 1924 Junie 1961
Ankara - Türkei - zit. nach
Grigoriu (10)
16. Kolle, W. u.
Hetsch, H. Experimentelle Bakteriologie und
Infektionskrankheiten. 11. Aufl.
Urban u. Schwarzenberg,
München, Berlin 1952, S. 323
17. Logan, M. A. u. a. Production of Cl. perfringens a
toxin.
J. Immunol. 51, 317 (1945)
18. Maschmann, E. Zit. nach Prevot (1956)
19. Mathes, S. Mündliche Mitteilung
20. Nagler, F. P. O. Observations on a reaction between
the lethal toxin Cl. welchii (type A)
on human serum.
Brit. J. Exper. Path. 20, 473
(1939)
21. Nagler, F. P. O. Experimentelle Untersuchungen über
die serologischen Eigenschaften
des Fraenkelschen Gasbacillus
(B. perfringens).
3. Mitt. Zschr. Immunit. forsch.
87, 273 (1940)

22. Oakley, C. L. The toxins of *Clostridium welchii*.
Bull. Hyg. 18, 781 (1943)
23. Oakley, C. L. u.
Warrack, C. H. Factors affecting the activity of
the alpha toxin of *Cl. welchii*.
J. Path. Bact. 53, 335 (1941)
24. Oakley, C. L. The toxins of *Cl. welchii* type F.
Med. J. 1, 267 (1949)
25. Oakley, C. L.,
Warrack, G. H. u.
Heyningen, W. E. van The collagenase (K-toxin) of
Cl. welchii type A.
J. Path. Bact. 58, 229 (1946)
26. Oakley, C. L.,
Warrack, G. H. u.
Warren, M. E. The kappa and lamda antigens of
Clostridium welchii.
J. Path. Bact. 60, 435 (1948)
27. Oakley, C. L. u.
Warrack, H. G. Routine typing of *Cl. welchii*.
J. Hyg. 51, 102 (1953)
28. Penfold, W. J.,
Tolhurst, J. C. u.
Wilson, D. Active Immunisation against gas
gangrene and Tetanus.
J. Path. Bact. 52, 187 (1941)
29. Prévot, A. R. Biologie des maladies dues aux
anaérobies.
Flammario, Paris (1955). S. 250
30. Prigge, R. Über Wirksamkeit und Antitoxingehalt
des Gasbrandserums.
Dtsch. med. Wschr. 63, 1906 (1937)
31. Prigge, R. Experimentelle Untersuchungen über
die serologischen Eigenschaften des
Fraenkelschen Gasbazillus.
2. Internat. Congress for Micro-
biology London (1936)
32. Roberts, R. S. Infectious diseases of animals.
Diseases due to Bacteria.
Vol. 1, S. 160, London (1958).
33. Ross, H. E.,
Warren, M. E. u.
Barnes, J. M. *Cl. welchii* L-toxin, its activation
by trypsin.
J. Can. Microbiol. 3, 148 (1949)
34. Ross, H. E. Discussion on clostridial toxins
in relation to type-specificity for
different species of host.
Proc. Roy. Soc. Med. 43, 883 (1950)

35. Seifert, G. Eine Reaktion menschlicher Sera mit Perfringenstoxin.
Zschr. Immunit. forsch. 96, 515
(1939)
36. Taylor, A. W. Zit. nach Grigoriu (10)
J. Comp. Path. 53, 50 (1943)
37. The Oxoid Manual of culture media. 2. Ed.
The Oxoid Division, Oxo. Ltd., London (1962, S. 156 u. 180)
38. Todd, E. W. The oxygen-labile haemolysin or
 ϵ -toxin of *Cl. welchii*.
Brit. J. Exper. Path. 28, 172 (1941)
39. Turner, A. W. u.
 Rodwel, A. W. Epsilon toxin of *Clostridium welchii*
 type D.
 2. Proteolytic conversion of
 protoxin into toxin by trypsin and
 other proteases.
Austral. J. Exper. Biol. 21, 17
 (1943)
40. Weinberg u. Goy Zit. nach Grigoriu (10)
41. Wildführ, G. Über die toxikologische Labilität
 der Gasödenrerger in künstlichen
 Nährsubstraten.
 Zschr. Immunit. forsch. 106, 369
 (1949)
42. Wildführ, G. Über die Toxinbildung der Gasödem-
 erreger im Kulturversuch und in
 synthetischen Nährsubstraten.
 Zbl. Bakt. I. Orig. 154, 272 (1949)
43. Wilsdon, A. J. Observations on the classification
 of *Bacillus welchii*.
 Rep. Inst. Anim. Path. Univ.
 Cambridge. 2, 53 (1931)
44. Wilsdon, A. J. The relationship of *Bacillus*
 ovitoxicus (Bennets) to the *Clo-*
 stridium *welchii* group.
 Rep. Inst. Anim. Path. Univ.
 Cambridge 3, 46 (1932/33)
45. Wright, C. P. Discussion on clostridial toxins in
 relation to typespecificity for diffe-
 rent species of host.
 Proc. Roy. Soc. Med. 43, 883 (1950)

Herrn Prof. Dr. H. Hartwig danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die hilfreiche Unterstützung, die er mir bei der Durchführung der Arbeit jederzeit zuteil werden ließ.

Ebenso möchte ich mich bei allen Angestellten des Institutes für die freundliche Aufnahme und die erwiesene Hilfsbereitschaft bedanken.

L e b e n s l a u f

Ich, Panteles T s i m a s , bin am 30. 1. 1935 als griechischer Staatsangehöriger in Galatz, Rumänien, geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule habe ich in Galatz, Bukarest (Rumänien) sowie in Thessaloniki (Griechenland) im ganzen 8 Jahre lang das Gymnasium besucht und bestand die Reifeprüfung im September 1952 am 6. Gymnasium, Thessaloniki.

Danach studierte ich 5 Jahre an der Aristoteles-Universität Thessaloniki und beendete dort mein Studium mit der Ablegung der Diplom-Prüfung als Tierarzt am 28. Juni 1960. Meine Bestallung als Tierarzt erhielt ich ebenfalls am 28. 6. 1960.

Danach war ich ca. 1 Jahr bei einem Tierarzt (Griechenland) als Assistent mit den verschiedensten Arbeiten betraut.

Von Januar 1962 bis Mai 1962 besuchte ich das Goethe-Institut in Berlin, um mich in der deutschen Sprache zu vervollkommen. Seit dem 1. Dezember 1962 bin ich als Stipendiat des Senats der Stadt Berlin bzw. des Deutschen Akademischen Austauschdienstes am Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin tätig.

